E 8-1

TIJDSCHRIFT OVER PLANTENZIEKTEN

IMP. INST. ENT.
— LIBRARY —
-8 DEC 1947
Eu. 86

JAARGANG 53 - 1947
5e AFLEVERING

Uitgave van de
NEDERLANDSE PLANTENZIEKTENKUNDIGE VERENIGING

Onder Redactie van
Prof. Dr W. K. J. ROEPKE; Mej. H. L. G. DE BRUYN; Dr J. A. A. M. H. GOOSSENS; Ir P. HUS en Dr A. J. P. OORT

Redactie-adres: Lab. v. Mycologie en Aardappelonderzoek, Wageningen

INHOUD

Blz.

Ir IJ. VAN KOOT en Drs G. WIERTZ. – Onderzoek naar de afstervingstemperaturen van enkele voor de plantengroei schadelijke bodem-organismen. With a summary: Investigations of the death-temperatures of some soil organisms injurious to plant growth 121

Dr L. ALGERA, Dr Ir T. H. THUNG en Ir J. P. H. VAN DER WANT – Over het zuiveren van plantenviren. With a summary: On the purification of plant viruses . . 133

H. L. G. DE BRUYN – Wisselbouw van aardappelrassen als bestrijdingsmiddel tegen schurft. With a summary: Rotation of potato varieties as a control of scab 139

BOEKBESPREKING

H. C. LONG and W. E. BRENCHLEY – Suppression of weeds by fertilizers and chemicals (door KOLE) 143

BESTUUR
VAN DE NEDERLANDSE PLANTENZIEKTENKUNDIGE VERENIGING

Prof. Dr Joha Westerdijk, Baarn, *voorzitster.*
Mej. Dr J. C. Went, Dalweg 10, Baarn, *secretaresse.*
Ir J. W. Seinhorst, Laboratorium voor Mycologie en Aardappelonderzoek, Wageningen, *penningmeester.* Postrekening no 346310 t.n.v. Penningm. Ned. Plantenziektenkundige Vereniging, Wageningen.
Prof. Ir W. J. Dewez, Wageningen.
Ir J. D. Gerritsen, Geldermalsen.
Dr A. D. Voute, Otterlo.
Dr D. J. Kuenen, Goes.

Lidmaatschap Ned. Plantenziektenkundige Vereniging

Nederland en Overzeese Gewesten f 5,—, België f 5,50 of 90 francs, Buitenland f 6,—. Leden ontvangen het tijdschrift gratis.

Abonnement Tijdschrift

Nederland en Overzeese Gewesten f 7,—, België f 7,— of 120 francs. Buitenland f 10,—.
Betalingen op postrekening 346310 t.n.v. Penningmeester Ned. Plantenziektenkundige Vereniging te Wageningen. Voor België op Postrekening 115754 van de Heer G. Roland, ingenieur agronome te Gembloux.

Advertentiën

Prijzen per plaatsing: ⅛ pag. f 7,50, ¼ pag. f 12,50, ½ pag. f 20,—, 1 pag. f 35,—.
Bij 6 maal plaatsen van dezelfde advertentie 10 procent korting.

Voor plaatsing wende men zich tot H. Veenman en Zonen, Wageningen, tel. 2389.

Onderzoek
naar de beste tijdstippen der voorjaarsbespuitingen
tegen Appel- en Perenschurft
Overdruk uit het „Tijdschr. over Plantenziekten", Deel 47 en 48

Uitgegeven vanwege de Nederlandsche Plantenziektenkundige Vereeniging

Prijs f 1.20

In de boekhandel en bij de Uitgevers H. VEENMAN & ZONEN - WAGENINGEN

TOTTE & CIE N.V. i. o.
Aelbrechtskade 84/85 - Rotterdam
Postbox 1109 - Telefoon 35725
★
o.a. uit voorraad leverbaar:
Loodarsenaat - Calcium Arsenaat Parijs Groen - Formaldehyde Zwavel - Kopersulfaat - Natriumchloraat en verdere plantenziektenbestrijdingsmiddelen

NEDERLANDSCHE NAMEN VOOR PLANTENZIEKTEN BIJ LANDBOUWGEWASSEN
UITGEGEVEN VANWEGE DE NEDERLANDSCHE PLANTENZIEKTENKUNDIGE VEREENIGING
Prijs 25 cent
In de boekhandel en bij de Uitgevers H. VEENMAN & ZONEN - WAGENINGEN

NEDERLANDSE
PLANTENZIEKTENKUNDIGE (PHYTOPATHOLOGISCHE) VERENIGING
TIJDSCHRIFT OVER PLANTENZIEKTEN

Onder redactie van Prof. Dr W. K. J. ROEPKE; Mej. H. L. G. DE BRUYN;
Dr J. A. A. M. H. GOOSSENS; Ir P. HUS en Dr A. J. P. OORT

Redactie-adres: Lab. voor Mycologie en Aardappelonderzoek, Wageningen
Drukkers-Uitgevers: H. Veenman en Zonen - Wageningen

53e JAARGANG (1947) **5e AFLEVERING** **SEPTEMBER-OCTOBER**

ONDERZOEK NAAR DE AFSTERVINGSTEMPERATUREN VAN ENKELE VOOR DE PLANTENGROEI SCHADELIJKE BODEM-ORGANISMEN [1])

With a summary: Investigations of the death-temperatures of some soil organisms injurious to plant growth

DOOR

Ir I J. van Koot en Drs G. Wiertz
Proeftuin Z.H. Glasdistrict, Naaldwijk

INLEIDING

Het is bekend, dat vele, zowel plantaardige als dierlijke, organismen, die ziekten of beschadigingen bij onze gewassen veroorzaken, in de grond kunnen overblijven en de plant van daaruit kunnen aantasten. In de tuinbouw wordt bij de zeer intensieve cultuur onder glas vaak getracht de grond te ontsmetten door deze te stomen. Het doel van ons onderzoek was, vast te stellen, tot welke temperatuur de grond daarbij verhit moet worden om er zeker van te zijn, dat alle schadelijke organismen gedood worden. Er is dus niet naar gestreefd nauwkeurig de afstervingscurve van elk dezer organismen te bepalen. Het was voor ons voldoende om te weten te komen, bij welke temperatuur een bepaalde parasiet beslist voor 100% gedood wordt. Deze temperatuur is slechts op grove wijze bepaald (hoogstens tot op 2,5° C nauwkeurig).

Er werd daarentegen veel aandacht besteed aan de invloed, welke de duur van verhitting uitoefent op de afstervingstemperatuur. De verwarming van de grond tengevolge van het stomen is nl. vaak zeer ongelijkmatig, in het bijzonder wanneer de grond tijdens het stomen in een slechte structuurtoestand verkeert, of wanneer enkele gaatjes in de buizen van het stoomrek verstopt zijn. De grond moet daarom steeds gedurende enige tijd na het stomen goed afgedekt blijven (b.v. met planken, stro of turfmolm). Op deze wijze blijft de grond langer op temperatuur en krijgt de warmte gelegenheid zich gelijkmatig door de grond te verspreiden. In dit verband interesseerde het ons, in hoeverre door een langdurige verhitting de verschillende schadelijke organismen gemakkelijker tot afsterving gebracht kunnen worden. Dit zou dan een reden te meer zijn om de grond na het stomen enige tijd afgedekt te houden.

Uit de literatuur zijn reeds vrij veel gegevens bekend over de afstervingstempe-

[1]) Ontvangen voor publicatie Juli '47.

raturen van de voornaamste in de grond overblijvende plantenparasieten. Een uitvoerig overzicht hiervan treft men aan bij NEWHALL (7). Betreffende het verband tussen de letale temperatuur en de duur van verhitting zijn de gegevens echter slechts schaars. Alleen bij het wortelaaltje van de tomaat, *Heterodera marioni* (CORNU) GOODEY, is dit verband reeds nauwkeurig voor elk ontwikkelingsstadium afzonderlijk vastgesteld (o.a. door HOSHINO en GODFREY (3)).

Betreffende de afstervingstemperatuur van *Fusarium*, *Verticillium* en *Sclerotinia* was onze kennis tot nu toe slechts fragmentarisch en had bovendien vaak betrekking op soorten of stammen, die voor de tuinbouw in het Westland van weinig of geen betekenis zijn (NEWHALL, 7). Over de afstervingstemperatuur van de koperworm (larven van *Agriotes* sp.) was feitelijk nog in het geheel niets bekend.

BEPALING VAN DE AFSTERVINGSTEMPERATUUR VAN FUSARIUM

Onderzocht werden de Fusaria, die in staat zijn verwelking te veroorzaken bij komkommer en meloen. Dit zijn de volgende Fusaria:

Fusarium angustum SHERB.,
Fusarium solani (MART.) APP. et WR. *var. Martii* (APP. et WR.) WR.,
Fusarium orthoceras APP. et WR. en
Fusarium orthoceras APP. et WR. *var. longius* WR.

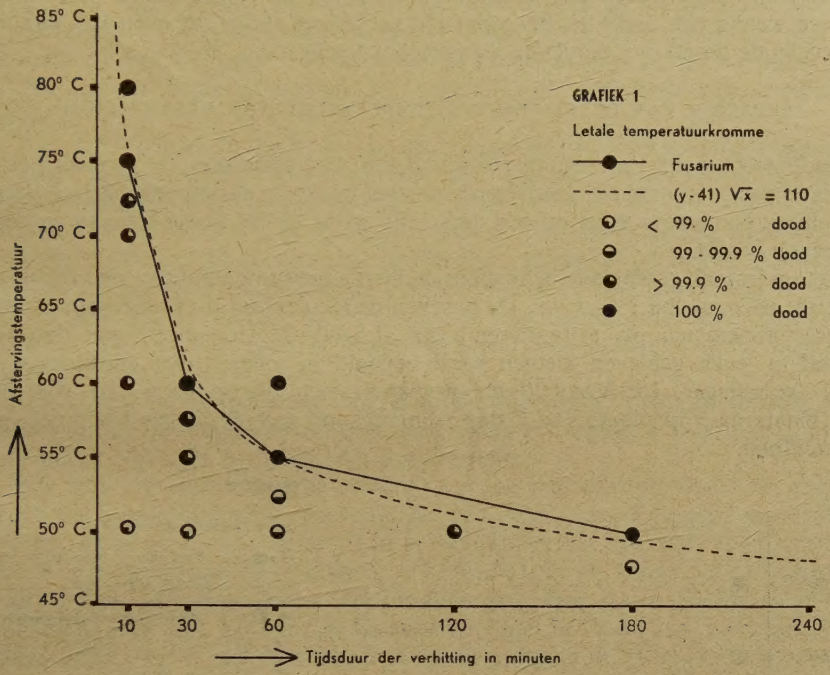
Daar onze interesse in hoofdzaak uitging naar de temperatuur, waarbij alle Fusariumkiemen gedood worden, werden van deze schimmels geen afzonderlijke afstervingstemperaturen bepaald, doch werd telkens een mengsel van alle bovengenoemde Fusaria beproefd.

De Fusaria werden voortgekweekt op buizen met gestoomde rijst. Bij elke proefneming werd met steriel gedestilleerd water van alle stammen een sporensuspensie gemaakt (voor elke stam van 1 buis) en deze sporensuspensies samengevoegd en goed gemengd. Hiervan werden gelijke hoeveelheden in een serie reageerbuizen gebracht, die vervolgens gedurende verschillende tijden tot temperaturen van 47,5–75° C verhit werden. Steeds bleef 1 contrôlebuis onverhit om de aanvangsconcentratie van de Fusariumkiemen vast te kunnen stellen.

De buizen werden gedurende de verhitting afgesloten met een wattenprop. De verhitting had plaats in een waterbad, waarvan de temperatuur geregeld kon worden. Tijdens de verhitting werden de buizen zover ondergedompeld, dat de gehele inhoud zich beneden het waterniveau van het waterbad bevond. Er werd verhit gedurende 10, 30, 60, 180 en een enkele maal ook 120 minuten. Daar de inhoud van de buis niet onmiddellijk de temperatuur van het waterbad aanneemt, werd bij de verhitting gedurende 10 minuten de buis 1 minuut langer ondergedompeld. Nadat de tijdsduur van verhitting verstreken was, werden de buizen steeds onmiddellijk overgebracht in een bak met koud water en aldus snel afgekoeld.

Om het aantal levensvatbare Fusariumkiemen na de verhitting vast te stellen, werden van de sporensuspensie de verdunningen 1 : 100 en 1 : 10.000 bereid. Zowel van deze beide verdunningen, als van de onverdunde sporensuspensie werd telkens 1 cc in een aantal schalen met kersenagar overgebracht (meestal 3 voor elke verdunning). Na 2 dagen werd het aantal Fusariumkoloniën geteld, dat zich op de platen ontwikkeld had. Door vergelijking met het aantal koloniën op de contrôleschalen kon berekend worden, welk percentage van de Fusariumkiemen de verhitting had overleefd.

Aanvankelijk werden proeven genomen bij temperatuursintervallen van 10° C. Nadat aldus ongeveer het afstervingsverloop van *Fusarium* bepaald was, werden bij de critische temperaturen eerst de tussenliggende intervallen van 5° C en vervolgens van 2,5° C onderzocht. Daarmede was de afstervingscurve voor ons doel met ruim voldoende nauwkeurigheid vastgesteld.



In grafiek 1 is de afstervingstemperatuur uitgezet tegenover de tijdsduur van verhitting. De curve, die het verband tussen deze beide grootheden weergeeft, staat hierop aangegeven. Bovendien zijn alle resultaten van de verhittingsproeven op overzichtelijke wijze op deze grafiek aangetekend.

Nu op deze wijze de afstervingstemperatuur van *Fusarium* in waterig milieu vastgesteld was, deed zich de vraag voor of deze resultaten eveneens geldig zouden zijn bij verhitting van de grond door deze te stomen. Bij het stomen zal natuurlijk een betrekkelijk vochtig milieu verkregen worden. Om meer zekerheid over dit punt te verkrijgen, werden nog een aantal verhittingen uitgevoerd, waarbij de sporensuspensie gebracht was in grond, die voor 75 % met water verzadigd was. Van deze grond werd 5 gram per reageerbuis gebruikt. Alvorens de sporensuspensie werd toegevoegd, werd de grond goed gesteriliseerd. Daar deze proefopzet veel bewerkelijker is, werd alleen verhit tot die temperaturen, waarbij in waterig milieu juist een volledige afsterving plaats heeft. In al deze gevallen bleek ook in vochtige grond de afsterving volkomen te zijn.

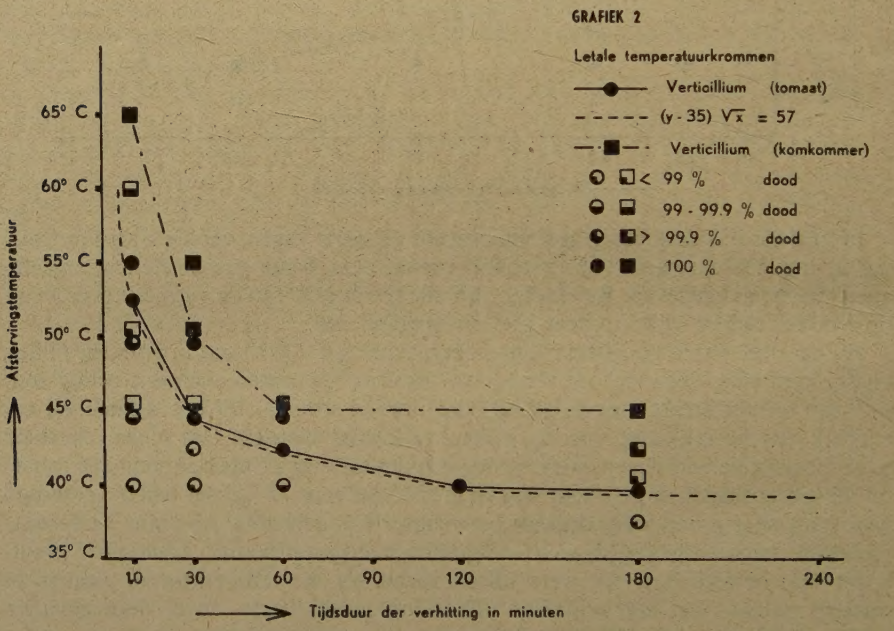
Dergelijke proeven zijn ook genomen in extreem zure grond (pH 4,2) en in extreem alcalische grond (pH 8,4). Hieruit bleek dat de Fusarium in een dergelijk milieu reeds bij een enkele graden lagere temperatuur afsterft dan in zuiver water. Dit was in het bijzonder het geval in de zure grond.

Uit grafiek 1 blijkt, dat de afstervingstemperatuur van *Fusarium* in sterke mate afhankelijk is van de duur van verhitting. Bij langdurige verhitting wordt bij een veel lagere temperatuur een algehele doding verkregen. Een verhitting langer dan 3 uur heeft echter weinig effect meer op de letale temperatuur. De letale temperatuur-kromme gaat dan vrijwel evenwijdig van de x-as lopen. Uit dit oogpunt bezien heeft een afdekking van de grond langer dan 3 uur na het stomen weinig zin. Zoals uit het volgende zal blijken, geldt dit evenzeer voor de andere in de grond overblijvende plantenparasieten.

BEPALING VAN DE AFSTERVINGSTEMPERATUUR VAN VERTICILLIUM

Onderzocht werd *Verticillium Dahliae* KLEB., een schimmel, die de slaapziekte bij de tomaat veroorzaakt. Deze werd voortgekweekt op aardappelagar in buizen. Bij elke proefneming werd op een dergelijke wijze als bij *Fusarium* een sporensuspensie bereid.

Het onderzoek geschiedde behoudens de hierna genoemde punten, op volkomen dezelfde wijze als bij *Fusarium*. De proeven hadden echter in 't algemeen bij een lagere temperatuur plaats (variërend van 37,5–60° C). De concentratie van het aantal in leven gebleven kiemen werd bepaald in schalen met aardappelagar i.p.v. kersenagar. De *Verticillium* ontwikkelt zich hierop beter. De contrôle had plaats na 3 in plaats van 2 dagen in verband met de langzamer groei van *Verticillium*.



In grafiek 2 is de afstervingstemperatuur uitgezet tegenover de duur van verhitting. De curve, die het verband tussen deze beide grootheden weergeeft, staat hierop aangegeven. Bovendien zijn alle resultaten van de verhittingsproeven op deze grafiek aangetekend.

De hier beproefde *Verticillium* werd meermalen geïsoleerd uit slaapzieke tomatenplanten. Ook uit zieke komkommerplanten werden verscheidene isolaties gemaakt. Daarbij werd echter steeds een *Verticillium* aangetroffen, die morphologisch vrij sterk afweek van de uit de tomatenplanten geïsoleerde stam. Zo vormt laatstgenoemde micro-sclerotiën, hetgeen de *Verticillium* van de komkommer niet doet. Deze vormt daarentegen veel meer sporen en op bepaalde voedingsbodems (havermout- en aardappelagar) een geelgroene kleurstof. Dit is ook vastgesteld op het Centraal Bureau voor Schimmelcultures in Baarn, waar beide typen gedetermineerd werden als verschillende stammen van *Verticillium Dahliae*.

Het is nu gebleken, dat er tevens een aanzienlijk verschil in afstervingstemperatuur tussen beide Verticillium-stammen bestaat. Merkwaardig is, dat de komkommerstam aanmerkelijk hogere temperaturen kan verdragen, dan de tomatenstam. Dit stemt goed overeen met de temperatuureisen, die deze beide gewassen stellen: de komkommer wordt in 't algemeen bij hogere temperatuur gekweekt dan de tomaat. Uit de Engelse literatuur (WILLIAMS, 12) is bekend, dat alleen op de tomaat al verschillende Verticillium-stammen voor kunnen komen, die niet alle dezelfde temperatuursbehoefte bezitten. Afstervingscurven zijn daar echter niet bepaald.

De afstervingstemperatuur van de komkommerstam is niet zo volledig onderzocht als bij de tomatenstam. Ook deze cijfers zijn uitgezet in grafiek 2, evenals de hieruit afgeleide letale temperatuur kromme.

De zeer lage afstervingstemperatuur van de tomatenstam opent de mogelijkheid tot zaadontsmetting door middel van warmwaterbehandeling. Weliswaar wordt de overgang van de Verticillium-schimmel met het zaad vaak betwijfeld, doch deze overgang is reeds door KADOW (4) in 1934 bij tomaat en aubergine aangetoond en later door OSMUN (8) bij aubergine. Ook uit in Naaldwijk genomen proeven bleek, dat *Verticillium* bij aubergine met het zaad kan overgaan. Anderzijds moet men er wel rekening mee houden, dat in de practijk veelal de grond de belangrijkste besmettingsbron is, waarbij de ziekte vooral op gronden met slechte structuur sterk tot uiting komt.

Bovengenoemde personen wezen reeds op de mogelijkheid tot zaad-ontsmetting door een warmwaterbehandeling gedurende 20–30 minuten bij 49–52° C. Er zijn daarom enkele kiemkrachtbepalingen gedaan bij tomaten- en auberginezaad, dat op verschillende wijze in water verhit werd. De resultaten waren als volgt:

	tomaat		aubergine	
	kiemenergie	kiemkracht	kiemenergie	kiemkracht
contrôle	89 %	96 %	0 %	34 %
20 minuten 48° C	82 %	89 %	0 %	44 %
20 minuten 50° C	78 %	89 %	0 %	36 %
20 minuten 52° C	91 %	99 %	0 %	26 %
1 uur 45° C	76 %	93 %	0 %	28 %
1 uur 48° C	90 %	92 %	0 %	26 %

Bij een andere proef, waarbij enkel tomatenzaad betrokken was, waren de resultaten als volgt:

	kiemenergie	kiemkracht
contrôle	60 %	95 %
30 minuten 50° C	75 %	99 %
30 minuten 52° C	75 %	99 %
1 uur 48° C	49 %	87 %
1 uur 50° C	45 %	92 %

Uit deze cijfers blijkt, dat door de verhitting de kieming eerder gestimuleerd dan benadeeld wordt. De kortstondige verhitting (niet langer dan een half uur) geeft in dit opzicht echter de beste resultaten. Bij verhitting gedurende 1 uur daalt de kiemenergie enigszins. Een verhitting gedurende 20 à 30 minuten tot 52° C, geeft bij tomaat de hoogste cijfers voor kiemenergie en kiemkracht te zien. Bij de aubergine werden de hoogste kiemkrachtcijfers bij wat lagere temperatuur verkregen (48 à 50° C). Dit zaad had echter een zeer slechte kiemkracht en was dus van zeer slechte kwaliteit. Wellicht was het daardoor ook wat minder goed bestand tegen verhitting. Waar de schimmel reeds gedood wordt door een verhitting gedurende 30 minuten bij 45° C bestaat er dus een zeer grote marge tussen de afstervingstemperatuur van de Verticilliumschimmel van de tomaat en de temperatuur, waarbij kiembeschadiging optreedt bij tomaten- en auberginezaad. Een warmwaterbehandeling kan dus zonder enig risico toegepast worden.

BEPALING VAN DE AFSTERVINGSTEMPERATUUR VAN SCLEROTINIA

Onderzocht werd *Sclerotinia Libertiana* Fuck., die het wortelrot bij witlof veroorzaakt. In hoeverre deze schimmel identiek is met de Sclerotinia-schimmels, waardoor tal van andere tuinbouwgewassen, zoals komkommer, meloen, tomaat, bonen en sla aangetast worden, is nog niet met volkomen zekerheid bekend. Aangenomen werd, dat de op deze gewassen gevormde sclerotiën de meest warmtebestendige uitingsvorm van deze schimmel zijn. In elk geval is het de belangrijkste vorm, waarin de schimmel in de grond overwintert. Alleen de sclerotiën werden dan ook aan de verhittingsproeven onderworpen. Waar op alle bovengenoemde tuinbouwgewassen overeenkomstige sclerotiën gevormd worden, is de kans niet groot, dat er belangrijke verschillen in temperatuur-gevoeligheid bestaan tussen deze Sclerotinia-schimmels. Er werd gewerkt met witlof-sclerotiën, omdat op de witlofwortels zulke bijzonder grote sclerotiën gevormd worden. Vermoed werd, dat deze eventueel de grootste warmteresistentie zouden bezitten.

Het bleek echter niet mogelijk deze proeven met in de natuur verzamelde sclerotiën uit te voeren. Tengevolge van de verhitting werd de uitgroeiing van de sclerotiën nl. vaak vertraagd. Zij werden dan overwoekerd door bacteriën en andere schimmels. Een goede contrôle was alleen mogelijk wanneer met steriele sclerotiën gewerkt werd. Ontsmetting van op de plant gegroeide sclerotiën bleek niet goed mogelijk. Dit gelukte wèl met sclerotiën, die op een agar-voedingsbodem gegroeid waren. De hierop gevormde sclerotiën hadden echter een minder grote afmeting.

De sclerotiën werden gekweekt op schalen met kersenagar (later met veenbessenagar). Bij elke proefneming werden 15 of 20 van de grootste sclerotiën verhit in 3 of 4 reageerbuizen met water. De sclerotiën uit elke buis (5 stuks)

werden tezamen overgebracht op een schaal met kersenagar (later met veenbessenagar).

Het was niet mogelijk om betrouwbare percentage-cijfers van de mortaliteit te verkrijgen. Tengevolge van de verhitting werd het uitgroeien van de sclerotiën meer of minder vertraagd. Het ene sclerotium groeide daarbij veel sneller uit dan het andere, zodat zij elkaar soms overgroeiden, waardoor niet altijd met zekerheid vastgesteld kon worden, hoeveel sclerotiën op een schaal nog levenskrachtig waren. De meer of mindere beschadiging kwam echter duidelijk tot uiting in de vertraging van de uitgroeiing. De schalen werden daarom gedurende enige weken bewaard, daar soms na geruime tijd nog uitgroeiing plaats had. De resultaten waren als volgt:

Temp. in °C	Duur van de verhitting in min.	Uitgroeiing	Temp. in °C	Duur van de verhitting in min.	Uitgroeiing
40	30	normaal	50	10	vertraagd
40	60	normaal	50	30	vertraagd
40	180	normaal	50	60	geen
42,5	180	vertraagd	52,5	30	geen
45	10	normaal	55	10	vertraagd
45	60	vertraagd	55	30	geen
45	180	geen	57,5	10	vertraagd
47,5	60	vertraagd	60	10	geen

Met het doel de uitgroeiing van de sclerotiën te versnellen zijn nog verschillende proeven genomen, waarbij uit de verhitte sclerotiën zo steriel mogelijk een coupe werd gesneden, die uitgelegd werd op veenbessenagar. Aldus is het ons één maal gelukt om een sclerotium, dat gedurende 10 minuten tot 60° C verhit was, te doen uitgroeien. Het is overigens twijfelachtig, of in het binnenste van grote sclerotiën bij een dergelijke kortstondige verhitting wel dezelfde temperatuur geheerst heeft als in de meer aan de buitenzijde gelegen delen.

In grafiek 3 is de afstervingstemperatuur uitgezet tegenover de duur van verhitting. De curve, die het verband tussen beide grootheden weergeeft, is eveneens getekend. Bovendien is aangegeven, bij welke temperaturen beschadiging van de sclerotiën (groeiremming) opgetreden is.

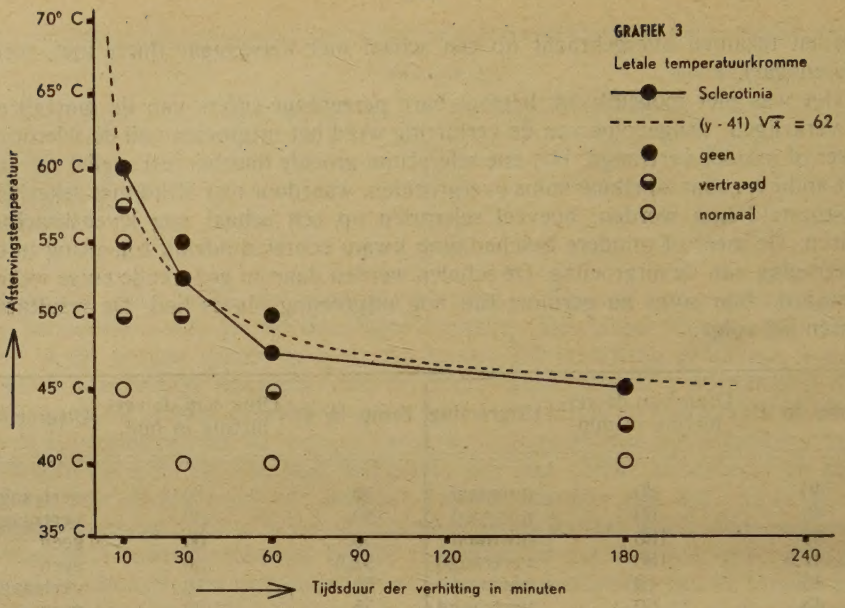
BEPALING VAN DE AFSTERVINGSTEMPERATUUR VAN RITNAALDEN OF KOPERWORMEN

Voor deze proef werden koperwormen gebruikt van verschillende vindplaatsen, die reeds enige maanden voortgekweekt waren in een mengsel van aarde en turfmolm, met als voedsel schijfjes aardappel, kiemende tarwe en een wortelende slaplant.

Bij determinatie aan de hand van een tabel van KORSCHEFSKY bleken ze zonder uitzondering tot het geslacht *Agriotes* te behoren.

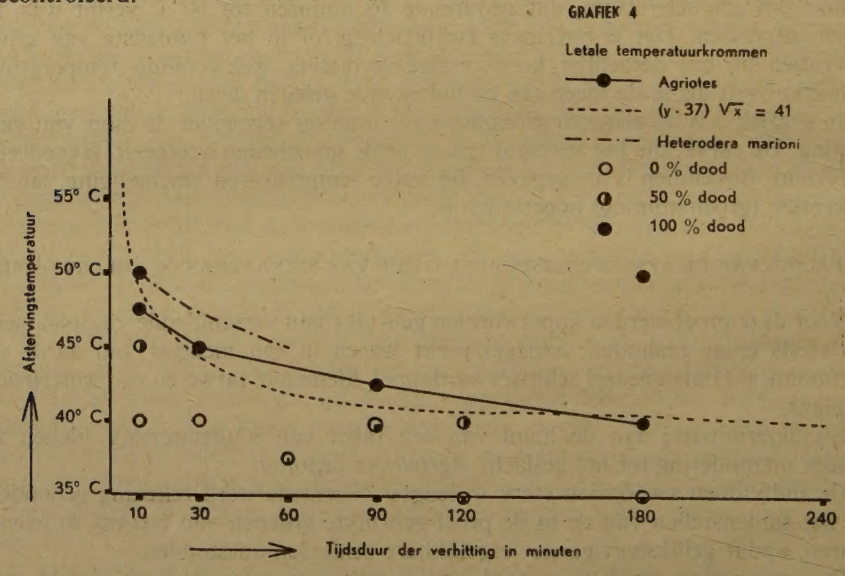
De individuen variëerden sterk in lengte. Hiermede werd rekening gehouden bij het samenstellen van de in de proef gebruikte groepen van telkens 20 exemplaren, opdat gelijksoortige en vergelijkbare eenheden ontstonden.

De verwarming werd uitgevoerd in reageerbuizen, voor de helft gevuld met een mengsel van aarde en turfmolm, dat met water verzadigd was. De buizen werden afgesloten met een wattenprop en bij de verwarming werden ze zover in



het waterbad ondergedompeld, dat de gehele inhoud zich beneden het waterniveau bevond.

Na de verwarming werd de buis direct leeggeschud. De koperwormen werden overgebracht in een petrischaal met een vers grondmengsel. Een schijfje aardappel diende daarin als voedsel. Gedurende enkele dagen werden de schalen dagelijks gecontroleerd.



In grafiek 4 is de afstervingstemperatuur uitgezet tegen de duur van verhitting. De curve, die het verband tussen deze beide grootheden weergeeft, staat

hierop aangegeven. Bovendien zijn alle resultaten der verhittingsproeven op deze grafiek aangetekend. [1])

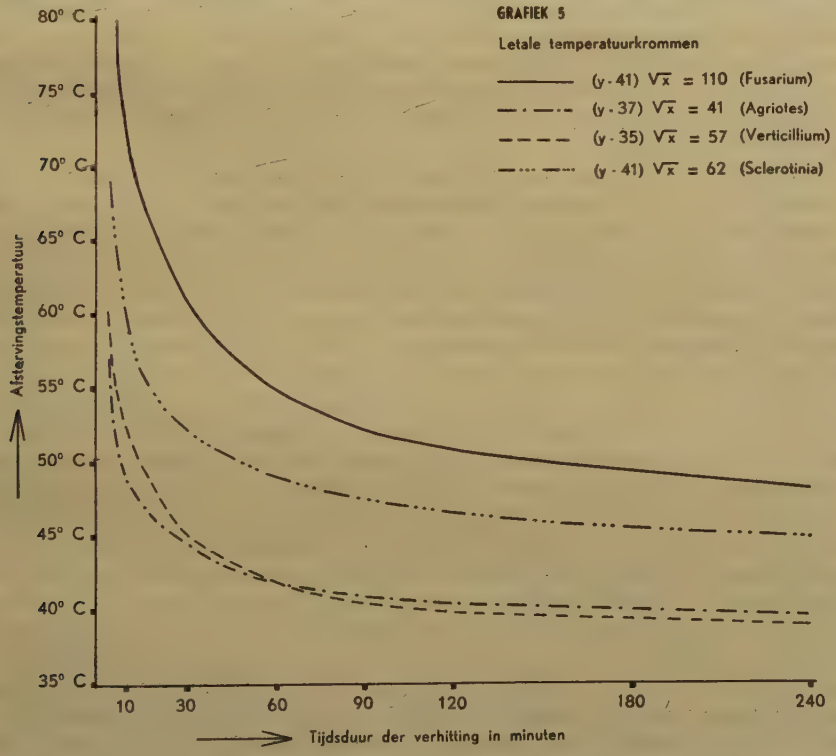
BEPALING VAN DE AFSTERVINGSTEMPERATUUR VAN HETERODERA MARIONI

Dit onderzoek is slechts zeer summier geweest. De temperatuurgevoeligheid van de verschillende ontwikkelingsstadia is niet afzonderlijk bepaald. Vastgesteld werd slechts bij welke temperaturen alle ontwikkelingsvormen van het aaltje gedood werden. De resultaten (afgebeeld in grafiek 4) zijn goed in overeenstemming met de gegevens, die uit de literatuur bekend zijn. Er zal daarom hierop niet verder worden ingegaan.

De cijfers in grafiek 4 hebben betrekking op verhitting in waterig milieu. Bij verhitting van cysten in grond werden hogere afstervingstemperaturen gevonden (in zure grond waren na 10 minuten verhitting tot 55° C nog lang niet alle aaltjes gedood).

DISCUSSIE

Alle gevonden letale temperatuurcurven zijn tezamen afgebeeld in grafiek 5.



Hierin valt onmiddellijk de grote gelijkenis op, die er tussen de verschillende lijnen bestaat. We hebben geprobeerd om het verloop van deze curven in een algemene formule weer te geven. Het blijkt dat de lijn, beantwoordend aan de vergelijking

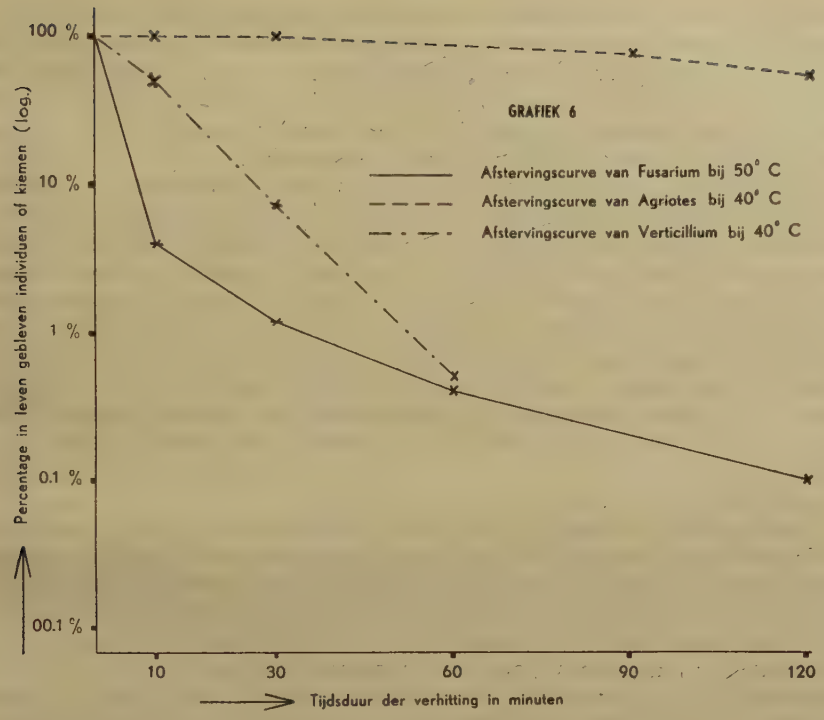
[1]) Daarbij zijn alleen de gegevens vermeld van de eerste contrôle, 24 uur na de proef, teneinde zoveel mogelijk andere invloeden op het afsterven buiten te sluiten.

$(y-a)\sqrt{x} = b$, goed overeenstemt met de gevonden waarden. Zo sluit de letale temperatuurcurve van *Fusarium* zeer nauw aan bij de lijn $(y-41)\sqrt{x} = 110$; de afwijkingen bedragen niet meer dan 1° C (zie grafiek 1). Deze liggen dus volkomen binnen de foutengrenzen, daar de afstervingstemperaturen slechts op 2,5° C nauwkeurig werden bepaald. De letale temperatuurcurve van de *Verticillium* van de tomaat sluit zo mogelijk nog beter aan bij de lijn $(y - 35)\sqrt{x} = 57$. De afwijkingen bedragen in dit geval maximaal 0,7° C (zie grafiek 2). De afstervingstemperaturen van de *Verticillium* van de komkommer zijn niet in een formule uitgedrukt in verband met de schaarse gegevens. Het verband tussen afstervingstemperatuur en duur van verhitting wordt bij *Sclerotinia Libertiana* zeer goed weergegeven door de formule $(y - 41)\sqrt{x} = 62$. De grootste afwijking bedraagt slechts 1° C. De curve voor de afstervingstemperaturen bij koperwormen sluit aan bij de lijn $(y - 37)\sqrt{x} = 41$. De grootste afwijking, –2,4° C, ligt nog juist binnen de foutengrens (zie grafiek 4).

Bovengenoemde curven hebben dus de gedaante van een ongelijkzijdige hyperbool. De opstijgende tak nadert asymptotisch tot de y-as, terwijl de horizontale tak een lijn evenwijdig aan de x-as, op een afstand a daarboven gelegen, asymptotisch nadert. Deze waarde a kunnen we opvatten als de maximumtemperatuur voor het organisme, dus de hoogste temperatuur waarbij het nog juist in leven kan blijven. Deze maximumtemperatuur is voor hogere organismen laag, terwijl ze voor lagere organismen sterk kan variëren. Bij *Verticillium* ligt ze ongeveer even laag als voor de hogere organismen, bij *Fusarium* daarentegen ligt ze aanmerkelijk hoger.

De waarde *b* vormt een maatstaf voor de resistentie van het organisme tegen verwarming boven de maximumtemperatuur. Des te hoger deze waarde is, des te moeilijker is het organisme door verhitting tot boven de maximumtemperatuur tot afsterving te brengen.

De opstijgende tak van de curve nadert veel sneller de y-as dan de horizontale tak de lijn nadert, die de maximumtemperatuur van het organisme weergeeft. Het blijkt dat het quadraat van het verschil tussen afstervings- en maximumtemperatuur ongeveer omgekeerd evenredig is met de duur van verhitting. Bij *Sclerotinia* en bij *Agriotes* zien we dat de opstijgende tak van de letale temperatuurkromme nog iets sneller tot de y-as nadert dan overeenkomt met de besproken formule. Waarschijnlijk zal dit toegeschreven moeten worden aan het geringe aantal individuen (kiemen) waarmee in deze gevallen gewerkt werd. Hierdoor worden te lage afstervingstemperaturen gevonden. Bij de kortstondige verhitting zijn deze afwijkingen het grootst, daar de temperatuurgrenzen, waar binnen partiële afsterving plaats heeft, wijder uiteenlopen, naarmate korter verhit wordt (zie o.a. grafiek 1). Ook het enigszins verschillend verloop van de letale temperatuurkrommen van de beide Verticillium-stammen moet waarschijnlijk aan het grote verschil in sporenvormend vermogen toegeschreven worden (bij komkommerstam veel meer sporen). De afstervingstemperaturen van *Sclerotinia* geven een betere aansluiting bij de theoretische curve te zien dan die van *Agriotes*. Het is wellicht niet juist een sclerotium als een enkel, homogeen individu te beschouwen. Waarschijnlijk kan bij de grenstemperaturen een belangrijk deel van het mycelium-weefsel afsterven; enkele zeer resistente gedeelten van het mycelium blijven dan nog in leven en kunnen, zij het met grote vertraging, uitgroeien. De meer of minder vertraagde uitgroeiing zou dan wellicht kunnen corresponderen met een hoger of lager percentage afgestorven myceliumweefsel in het sclerotium.



Op grafiek 6 is het verloop van de afsterving voor koperwormen en *Verticillium* (de tomatenstam) bij 40° C en voor *Fusarium* bij 50° C weergegeven. Daartoe is in horizontale richting de duur van de verhitting uitgezet en in verticale richting de logarithme van het percentage in leven gebleven individuen (resp. kiemen). Het is reeds lang bekend (MADSEN en NYMAN, 6; EYKMAN, 2 en RAHN, 9, 10 en 11), dat bij lagere organismen dit verloop rechtlijnig is. Dit betekent, dat de afsterving bij lagere organismen verloopt als een mono-moleculaire chemische reactie. Bij hogere organismen heeft de afsterving hetzelfde verloop als een meer- (b.v. 6- of 10-) moleculaire chemische reactie. Dit wordt weergegeven door een gebogen lijn met haar krommingsmiddelpunt aan de zijde van de oorsprong van het coördinaten-stelsel. Dit betekent, dat bij toenemende verhittingsduur de afstervingssnelheid groter wordt. Een dergelijk verloop werd bij de afstervingscurve van de koperworm ook inderdaad gevonden. Bij *Fusarium* treffen we een curve van afwijkende vorm aan, waarbij de lijn naar de oorsprong toegebogen is. Volgens CHICK (1), RAHN (9) en KLUYVER (5) wijst een curve van een dergelijke gedaante op een heterogeniteit van het verhitte materiaal. Bij onze proeven is eveneens met heterogeen materiaal gewerkt, daar de Fusariumkiemen voor het belangrijkste deel uit conidiën bestonden, die waarschijnlijk aanzienlijk gevoeliger voor verhitting zijn dan de dikwandige chlamydosporen, waarvan tevens een gering aantal in het onderzochte materiaal aanwezig was (zie grafiek 6). Een andere mogelijke verklaring kan gelegen zijn in de omstandigheid, dat in het onderzoek naar de afstervingstemperatuur van *Fusarium* een mengsel van vier verschillende, voor de komkommer pathogene, Fusarium-rassen gebruikt is. Ver-

moedelijk zouden we bij *Fusarium* een rechtlijnig verloop van de afstervingscurve gevonden hebben wanneer we met homogeen materiaal gewerkt hadden. Bij *Verticillium* (de tomatenstam) is dit blijkbaar wel het geval geweest. Daar werd althans een rechtlijnig verloop aangetroffen. Hier werd ook inderdaad met slechts een stam gewerkt, terwijl bij microscopisch onderzoek nimmer de aanwezigheid van chlamydosporen vastgesteld kon worden.

Opmerkelijk is, dat de verschillende in de grond overblijvende plantenparasieten reeds door betrekkelijk lage temperaturen tot afsterving gebracht kunnen worden. Bij het stomen zal de grond gewoonlijk tot een veel hogere temperatuur verhit worden. Toch wordt meer dan eens geklaagd over een onvoldoende resultaat van het stomen. In vele gevallen zal men dit niet mogen wijten aan een onvoldoende grondontsmetting. In bepaalde gevallen is het wel is waar mogelijk, dat de grond niet tot op voldoende diepte ontsmet is. Dit komt nog al eens voor bij een te hoge grondwaterstand. De warmte dringt dan niet tot op voldoende diepte in de grond door. Ook bij grondontsmetting van platglasrijen tegen *Fusarium* komt het vaak voor, dat de grond niet tot op voldoende diepte verhit wordt, waardoor bij het klaarmaken van de rijen niet ontsmette grond boven gebracht wordt.

In vele gevallen zal een slecht resultaat echter geweten moeten worden aan een hernieuwde besmetting, die het gevolg kan zijn van het gebruik van niet ontsmet gereedschap en houtwerk, en het niet ziektevrij opkweken van het plantmateriaal. Een hernieuwde besmetting met *Fusarium*, *Verticillium* of *Sclerotinia* geeft vaak aanleiding tot een zeer sterke aantasting. Deze schimmels kunnen zich blijkbaar in gestoomde grond extra krachtig ontwikkelen. Hiervan zijn ons talrijke voorbeelden bekend. Het is dus van het grootste belang steeds een goede hygiëne in acht te nemen, daar anders de toch nog al dure grondontsmetting niet de best mogelijke resultaten af zal werpen.

SAMENVATTING

Van een aantal voor de plantengroei schadelijke bodemorganismen werd het verloop van de afsterving bij verschillende temperaturen nagegaan (zie grafieken 1–5).

Het verband tussen de duur van verhitting (x) en de afstervingstemperatuur (y) wordt goed weergegeven door een curve van de algemene gedaante $(y - a)\sqrt{x} = b$.

Bij een grondontsmetting door stomen is het gewenst de grond ook na de behandeling ongeveer 3 uur afgedekt te houden.

Bij de volgende temperaturen wordt een afdoende doding verkregen: Fusarium 70° C; *Sclerotinia* en *Verticillium* (komkommerstam) 60° C; *Heterodera marioni* 55° C; *Verticillium* (tomatenstam) en *Agriotes* (ritnaalden) 50° C.

Tomatenzaad kan ontsmet worden tegen *Verticillium* door het een half uur onder te dompelen in water van 45°–50° C. De kiemkracht van het zaad wordt hierdoor niet in het minst geschaad.

SUMMARY

For a number of soil-organisms, injurious to plant-growth, the process of dying-off was examined at different temperatures (see curves 1–5).

The relation between the period of heating (x) and the death-temperature (y) is expressed reasonably well in a curve of the general form: $(y - a)\sqrt{x} = b$.

In sterilizing the soil by steaming it is desirable to keep the ground covered, also after the treatment, for about three hours.

At the following temperatures a thorough killing-off is obtained:

Fusarium 70° C; *Sclerotinia* and *Verticillium* (from cucumber) 60° C; *Heterodera* 55° C; *Verticillium* (from tomato) and *Agriotes* (wireworms) 50° C.

Tomatoseed may be rendered sterile against Verticillium by submerging it it water of 45°–50° C for half an hour. By this treatment the germinative power is not harmed in the least.

LITERATUUR

1. Chick, H., J. Hyg. 8, 1908 en 10, 1910.
2. Eykman, C., Folia Microbiologica I, 359, 1912.
3. Hoshino, H. M. en G. H. Godfrey, Phytopathology 23, 260, 1933.
4. Kadow, K. J., Phytopathology 24, 1265, 1934.
5. Kluyver, A. J., Versl. XIXe conf. over voedingsmiddelenscheikunde op 13 Dec. 1940 te Amsterdam.
6. Madsen en Nyman, Z. Hyg. u. Inf. Krkh. 57, 1907.
7. Newhall, S. G., Cornell Univ. Agric. Exp. St. Bull. 731, 1940.
8. Osmun, A. V., (Dep. of Bot.) Rep. Mass. Agric. Exp. St. Bull. 339, 25, 1937.
9. Rahn, O., J. Gen. Physiol. 13, 395, 1930.
10. Rahn, O., Gold Spring Harbour Symposia on Quantitative Biology 2, 70, 1934.
11. Rahn, O. en M. N. Barnes, J. Gen. Physiol. 16, 579, 1933.
12. Williams, P. H., Cheshunt Exp. and Res. St. Ann. Rep., 29, 1943.

OVER HET ZUIVEREN VAN PLANTENVIREN[1])

With a summary: On the purification of plant viruses

DOOR

Dr L. Algera, Dr Ir T. H. Thung en Ir J. P. H. van der Want

(Lab. v. Bloembollenonderzoek, Lisse; Instituut voor Plantenziekten, Buitenzorg; Lab. v. Mycologie en Aardappelonderzoek, Wageningen)

INLEIDING

De viruszuivering is een onderwerp, waarvoor onder phytopathologen grote belangstelling bestaat. Uit talrijke onderzoekingen is duidelijk geworden van welke betekenis de zuivering voor het onderzoek der plantenviren is. Zo is het voor inoculatieproeven soms beter met gezuiverd virushoudend sap te werken dan met ongezuiverd sap. Ook kan men bij het serologisch onderzoek van plantenviren dikwijls met meer succes het proefdier, ter winning van antiserum, inspuiten met een gezuiverde virusoplossing dan met ongezuiverd sap. De electronenmicroscopie, het nieuwste hulpmiddel in het virusonderzoek, vereist tenslotte doorgaans eveneens gezuiverde viruspreparaten.

In de practijk is de wens geuit met eenvoudige methoden kennis te maken, ten-

[1]) Ontvangen voor publicatie Sept. 1947.

einde in weinig geoutilleerde laboratoria, zoals die der Middelbare landbouwscholen en die der proeftuinen, practisch zuivere viren te verkrijgen.

Aan de hand van de literatuur zullen verschillende methoden van viruszuivering beschreven worden.

Reeds vóór STANLEY hebben enige onderzoekers met meer of minder succes beproefd viren te zuiveren en te concentreren. Na 1935 is de literatuur betreffende de viruszuivering echter belangrijk verrijkt. Een historisch overzicht geeft BAWDEN (1), waarnaar verwezen moge worden.

STANLEY (12) heeft in 1935 het tabaksmozaïekvirus in practisch volkomen zuivere toestand kunnen afscheiden, naar hij meende in de vorm van echte kristallen. Deze opvatting bleek echter later niet geheel juist te zijn. Echte kristallen zijn immers in 3 dimensies regelmatig opgebouwd. Bij de naaldvormige deeltjes van het tabaksmozaïekvirus, die STANLEY na zuivering verkreeg is er slechts een regelmatige rangschikking van de eiwitmoleculen in 2 dimensies, terwijl de rangschikking in de derde dimensie onregelmatig is (5). Men spreekt in dit geval dan ook liever van parakristallen of vloeibare kristallen. Toch zijn er viren bekend, die in ware kristallijne vorm kunnen worden verkregen.

Het is dus niet alleen mogelijk gebleken met bepaalde kunstgrepen een zeker virus te concentreren en te bevrijden van diverse normale celbestanddelen van de plant, tevens is het mogen gelukken in enkele gevallen het virus in kristallijne of parakristallijne vorm af te scheiden, zoals het reeds genoemde tabaksmozaïekvirus (7,12), het „bushy stunt" virus van de tomaat (3), de verschillende viren van het „tobacco necrosis" type (1), het virus van het „Southern bean" mozaïek (10) en ten slotte dat van het „yellow mosaic" van koolraap en Chinese kool (8). Van een aantal andere viren zijn met de zuiveringsmethoden slechts amorphe producten verkregen.

ZUIVERINGSMETHODEN

Eenvoudig te zuiveren viren. De met beperkte middelen uitvoerbare zuiveringsmethoden worden in Holland door ons in Wageningen en in Lisse toegepast. Wij ontleenden deze methoden aan die gevolgd te Rothamsted (Engeland). De voornaamste van deze methoden verschilt niet wezenlijk van die, welke STANLEY publiceerde. Zij berust hierop, dat men het virus na voorafgaande verwijdering van het gros der normale celbestanddelen uit het virushoudend plantenperssap, uitzout met ammoniumsulfaat. Naar BAWDEN (1) aangeeft, kunnen alle tot nu toe bestudeerde viren in neutraal milieu door toevoeging van ammoniumsulfaat neergeslagen worden. De sterkte van de te gebruiken ammoniumsulfaat-oplossing is van diverse factoren afhankelijk, zoals het soort van virus, de pH van de virusoplossing, de zuiverheid en de temperatuur.

Vanzelfsprekend kan de zuivering alleen worden toegepast op viren, die met sap kunnen worden overgebracht en die niet binnen zeer korte tijd na het uitpersen van het sap inactief worden.

De methode kan in het volgend schema worden samengevat:

1. Jong virushoudend plantenmateriaal wordt uitgeperst.
2. Het perssap wordt gedurende 10 minuten verhit op 60° C; de planteneiwitten en andere normale celbestanddelen (zoals bladgroenkorrels) slaan neer.

   Het virus blijft echter in oplossing. Meestal bevat sap van jonge planten, die gedurende de wintermaanden zijn besmet met een virus en korte tijd na

het tot uiting komen van de ziektesymptomen worden uitgeperst, relatief de minste hoeveelheid normale plantenbestanddelen.

2*a*. Indien het een virus betreft, dat bij 60° C of lagere temperatuur geïnactiveerd wordt, voegt men per 100 cm^3 perssap 30 cm^3 4 % Na_2HPO_4-oplossing toe. Hierdoor slaan ook normale celbestanddelen neer, terwijl het virus in oplossing blijft.

3. Het neerslag in het volgens 2 of 2*a* behandelde sap wordt afgecentrifugeerd (bij 2 tot 3000 omwentelingen per minuut); de heldere bovenstaande vloeistof wordt afgeschonken en per 100 cm^3 vloeistof wordt 25 g ammoniumsulfaat bij kleine hoeveelheden tegelijk toegevoegd. De ammoniumsulfaat-oplossing heeft dan ongeveer $^1/_3$ van de verzadiging bereikt. Door roering brengt men het sulfaat in oplossing, waarna het virusmateriaal zich gaat afscheiden.

4. Het ontstane virusneerslag wordt afgecentrifugeerd; vervolgens wordt de bovenstaande vloeistof afgeschonken. Het virusneerslag wordt in een weinig gedestilleerd water weer in oplossing gebracht.

5. Door middel van centrifugeren kunnen thans ongewenste, niet in oplossing gebrachte onzuiverheden verwijderd worden; het virus blijft echter in oplossing.

6. Het viruseiwit wordt opnieuw neergeslagen met ammoniumsulfaat en afgecentrifugeerd. Eventueel kan men het neerslaan en weer oplossen nog enkele malen herhalen.

7. Het viruseiwit wordt in een geringe hoeveelheid gedestilleerd water opgenomen; deze oplossing wordt in cellophaanhulzen gedialyseerd om het zout te verwijderen: 2 maal een etmaal ten opzichte van leidingwater, vervolgens 2 maal een etmaal ten opzichte van gedestilleerd water.

Met deze eenvoudige werkwijze gelukte het BAWDEN en PIRIE (3) het „bushy stunt"-virus van de tomaat in zuivere kristallijne vorm af te zonderen. Bij deze zuivering werd tevens gebruik gemaakt van de eigenschap, dat het virus bij kamertemperatuur na toevoeging van ammoniumsulfaat in amorphe toestand neerslaat, doch bij 0° C in de vorm van fraaie dodecaheders. Het bleek, dat de verhitting van het virushoudend perssap gedurende 10 minuten op 60° C ter coagulatie van de normale sapbestanddelen, een enigszins inactiverende invloed op het virus uitoefende. Daarom was het beter de normale plantenstoffen neer te slaan met Na_2HPO_4. Dit is door BAWDEN en PIRIE (4) beschreven, waarbij zij tevens vermelden, dat de virusoplossing, verkregen door het met ammoniumsulfaat uitgezoute virus weer in water op te lossen, bevrijd kan worden van onzuiverheden door de pH van de oplossing met verdund azijnzuur op 4 te brengen. Het virus blijft bij deze pH in oplossing, de onzuiverheden slaan neer. Na afcentrifugeren van dit neerslag is de werkwijze als volgt: men voegt onder roering druppelsgewijze een verzadigde ammoniumsulfaat-oplossing toe tot een zwakke troebeling ontstaat, waarna men het virushoudend sap in smeltend ijs plaatst. Na enige tijd verdwijnt de troebeling weer en gaat het virus zich in kristallijne toestand afscheiden. Binnen 48 uur is al het virus uitgekristalliseerd.

Ook ons gelukte het op deze eenvoudige wijze de kristallen van het „bushy stunt" virus te verkrijgen. Deze zuiveringsmethode werd ook toegepast op het virus, dat de ratelziekte van de tabak veroorzaakt. Deze ziekte is door QUANJER (11) beschreven. De eerste zuivering van het virushoudend perssap van jonge tabakszijscheuten kon door een verhitting gedurende 10 minuten op 60° C be-

werkstelligd worden, aangezien het virus pas tussen 70 en 75° C geïnactiveerd wordt. Het virusneerslag, dat met ammoniumsulfaat verkregen werd, was amorph en bruin gekleurd. Na 2 × uitzouten met ammoniumsulfaat kon het na afcentrifugeren en weer oplossen in een weinig gedestilleerd water minstens 3 maanden lang bij 12° C bewaard worden, zonder zijn infectievermogen te verliezen.

Bij de viruszuivering kunnen echter nog andere middelen dan het uitzouten met ammoniumsulfaat te hulp geroepen worden. Zo kan men b.v. na het oplossen van het met ammoniumsulfaat verkregen neerslag van het tabaksmozaïekvirus, dit virus in vrij zuivere vorm afscheiden door de pH van de virusoplossing op 3,4 te brengen; dit is nl. het isoëlectrische punt van dit virus (6).

Men kan dit bereiken met verdund zout- of azijnzuur, waarbij men reageert t.o.v. broomphenolblauw, welks omslagpunt bij ongeveer pH = 3,4 ligt. Bepaalde onzuiverheden, die door de voorafgaande behandeling met ammoniumsulfaat te zamen met het virusproteïne waren neergeslagen, blijven thans in oplossing, zodat de aanzuring sneller tot het doel: de zuivering van het virus, leidt. Volgens Bawden en Pirie (4) is het virus echter alleen onoplosbaar bij pH = 3,4 in aanwezigheid van zouten, in dit geval restanten ammoniumsulfaat.

Een oplossing van tabaksmozaïekvirus in een weinig gedestilleerd water vertoont sterke dubbelbreking bij stroming. Zuurt men deze oplossing aan dan ontstaat een neerslag, dat een fraaie zijdeachtige glans vertoont. Dit is het tabaksmozaïekvirus in vrij zuivere vorm.

Price (10) paste bij de zuivering van het „Southern bean" mozaïekvirus alcohol toe. Hij precipiteerde eerst met ammoniumsulfaat, loste daarna weer op in water en voegde vervolgens 30 % alcohol toe. Het virus is hierin oplosbaar, doch bepaalde verontreinigingen niet. Na afcentrifugeren van deze verontreinigingen kon de virusoplossing ten tweede male met ammoniumsulfaat worden behandeld. Het virus werd, door ultracentrifugeren van de met ammoniumsulfaat behandelde virusoplossing, in kristallijne vorm verkregen.

Het laatste virus, dat in kristallijne vorm is verkregen, is dat van het „turnip yellow mosaic" (8). Het perssap van viruszieke Chinese kool werd door centrifugeren van de grove delen bevrijd, waarna het met $^1/_3$ volume 97 % alcohol werd gemengd. Het neerslag, dat thans ontstond, bevatte het virus. Het werd na enige uren staan afgecentrifugeerd, de lichtgekleurde vloeistof werd afgeschonken en het groene neerslag uitgetrokken met $^1/_2$ % NaCl-oplossing; de hoeveelheid nodigde NaCl-oplossing was ongeveer $^1/_3$ tot $^1/_2$ van de oorspronkelijke hoeveelheid perssap. Daarna werden de onopgeloste bijproducten afgecentrifugeerd. Door toevoeging van ammoniumsulfaat aan de heldere vloeistof tot $^1/_3$ verzadiging werd het virus in kristallijne vorm neergeslagen. Na enige tijd was de smetstof volledig geprecipiteerd en konden de kristallen afgecentrifugeerd worden.

Moeilijker te zuiveren viren. Gelukte het bij de bovenbeschreven viren meer of minder gemakkelijk het virus in para-kristallijne of zelfs kristallijne toestand af te scheiden, bij het aardappel X-virus vormen de para- (of vloeibare) kristallen zich slechts bij zeer sterk gezuiverde preparaten, daar hun vorming bemoeilijkt wordt door de aanwezigheid van onzuiverheden (1).

In de regel gaat men bij de zuivering uit van geïnfecteerde tabaksplanten, daar het X-virus hierin een hogere concentratie bereikt dan in de aardappelplant.

Bawden en Pirie (2) bevriezen het perssap eerst en voegen na het ontdooien 15 g Na_2HPO_4 per liter sap toe. Na centrifugeren wordt òf 185 g $(NH_4)_2SO_4$ per per liter toegevoegd òf het sap wordt met 0,1 n HCl op pH = 4,5 gebracht. Bij beide methoden wordt al het virus neergeslagen. Het neerslag wordt afgecentrifugeerd en opgelost in een volume water, dat gelijk is aan een tiende deel van het oorspronkelijke sap. De suspensie wordt met NaOH geneutraliseerd en gecentrifugeerd tot zij helder is. De bovenstaande vloeistof vertoont nu stromingsdubbelbreking als zij in een buisje tussen gekruiste nicols wordt geschud.

Op deze wijze is dus reeds de aanwezigheid van het X-virus aan te tonen. Wil men verder zuiveren, dan dient men het neerslaan met $(NH_4)_2SO_4$ een aantal malen te herhalen, waarbij telkens met behulp van enkele druppels NaOH-oplossing de pH neutraal moet worden gehouden. Zodra de bovenstaande vloeistof geheel helder is, wordt de pH met azijnzuur op 4,5 gebracht. Het door dit aanzuren gevormde neerslag bevat in de regel al het X-virus. Door wassen met water van pH = 4,5 wordt dit neerslag van $(NH_4)_2SO_4$ bevrijd. Hoewel het preparaat nu sterke stromingsdubbelbreking vertoont, is het steeds bruingekleurd en nooit vloeibaar kristallijn. Voor verdere zuivering is òf trypsine òf een centrifuge met hoog toerental nodig.

In het eerste geval wordt het viruspreparaat gedurende 90 minuten bij pH = = 7,5 en 38° C met 0,05 % trypsine behandeld. Wel wordt hierbij ongeveer een derde deel van het X-virus ontleed, doch de onzuiverheden zijn gevoeliger voor de trypsine zodat het preparaat in de regel kleurloos wordt. Na een aantal precipitaties met ammoniumsulfaat en zuur, vormt zich een vloeibaar kristallijne oplossing.

In het tweede geval kan $^1/_5$ tot $^1/_3$ deel van het virus worden gesedimenteerd door het preparaat gedurende 3 uren te centrifugeren in een veld van 16000 × de zwaartekracht. Het sediment wordt in water opgelost. Uit deze oplossing kan bruin materiaal, dat veel koolhydraten bevat, worden verwijderd door centrifugeren bij 3000 toeren per minuut. Door herhaling van afwisselend centrifugeren bij hoog en laag toerental kan een kleurloos viruspreparaat worden verkregen.

Pfankuch en Kausche (9) verdunnen het perssap (weer van de tabak) eerst met het dubbele volume water en roeren dit verdunde sap dan bij kamertemperatuur gedurende 20 minuten zeer krachtig met $^1/_7$ van zijn volume chloroform. Men dient hierbij te voorkomen, dat de roerder lucht door de vloeistof zuigt en de oplossing schuimt. De door de chloroform gecoaguleerde sapbestanddelen worden onmiddellijk daarna gedurende 20 minuten bij 3000 toeren afgecentrifugeerd en de bovenstaande vloeistof gedurende minstens 15 uren in een koelkast bewaard. Na centrifugeren bij 3000 toeren wordt aan de afgeschonken vloeistof het halve volume koude verzadigde $(NH_4)_2SO_4$-oplossing toegevoegd. Na ongeveer een half uur volgt afcentrifugeren van het in deze $^1/_3$ verzadigde $(NH_4)_2SO_4$-oplossing ontstane neerslag; nu lost men het sediment op in $^1/_{30}$ m fosfaatbuffer pH = 7. Deze oplossing is slechts zwak gekleurd en bevat geen laagmoleculaire eiwitten meer.

De ammoniumsulfaat-behandeling wordt nog eenmaal herhaald en het sediment weer in fosfaatbuffer opgelost. Het aan het sediment hechtende $(NH_4)_2SO_4$ wordt verwijderd door dialyse in cellophaan gedurende liefst 15 uren in stromend leidingwater. De gedurende deze behandeling gevormde vlokken centrifugeert men af.

Uit deze oplossing kan ongeveer $^1/_3$ tot $^1/_4$ deel van het aanwezige X-virus worden neergeslagen door 3 uren lang te centrifugeren bij 15000 toeren per minuut. Het gesedimenteerde X-virus wordt opgelost in gedestilleerd water of $^1/_{10}$ m fosfaatbuffer pH = 7.

Zoals uit het bovenstaande blijkt, kan in alle tot nu toe bestudeerde gevallen het uitzouten met ammoniumsulfaat worden toegepast om viren te concentreren. Voor een practische toepassing van de viruszuivering zal dit in de meeste gevallen voldoende zijn. Met vrij eenvoudige hulpmiddelen kan men dan volstaan; slechts dient men de beschikking te hebben over een centrifuge men een omwentelingssnelheid van 2–3000 toeren per minuut.

Om viren in kristallijne, resp. parakristallijne toestand te verkrijgen, zijn doorgaans gecompliceerder methoden nodig, waarbij men diverse chemicaliën toepast. Het gebruik van deze chemicaliën is echter afhankelijk van de eigenschappen van het virus, dat men wil isoleren. De middelen, die in het ene geval voldoen, behoeven in het andere geen gunstig resultaat op te leveren. Slechts door het experiment kan men uitmaken welke methode het beste gevolgd zal kunnen worden.

SUMMARY

Some methods of virus purification are discussed. A distinction has been made between the purification, which can be obtained in a rather simple way (e.g. of the viruses of tobacco mosaic, tomato bushy stunt and turnip yellow mosaic) and that, which require a more complicated manipulation (e.g. of the potato virus X).

Information is given about the concentration through salting out with ammonium sulphate of the virus causing the „ratelziekte" of tobacco. Previously the normal cell constituents had been mostly removed by heating the expressed sap of diseased tobaccoplants during 10 minutes at 60° C and then centrifuging off the coagulum. The partly purified virus (a brown, amorphous product has been obtained) could be preserved at 12° C during at least 3 months without losing infective power.

LITERATUUR

1. Bawden, F. C.: Plant viruses and virus diseases. Waltham, Mass. 1943.
2. Bawden, F. C. and N. W. Pirie: Liquid crystalline preparations of potato virus „X". The Brit. Journ. of Exper. Path. 19, 66–82, 1938.
3. Bawden, F. C. and N. W. Pirie: Crystalline preparations of tomato bushy stunt virus. The Brit. Journ. of Exper. Path. 19, 251–263, 1938.
4. Bawden, F. C. and N. W. Pirie: Methods for the purification of tomato bushy stunt and tobacco mosaic virus. The Biochem. Journ. 37, 66–70, 1943.
5. Bernal, J. D. and I. Fankuchen: Structure types of protein „crystals" from virus infected plants. Nature 139, 923–924, 1937.
6. Best, R. J.: Precipitation of the tobacco mosaic virus complex at its isoelectric point. Austr. Journ. of Exper. Biol. and Med. Science 14, 1–13, 1936.
7. Koot, IJ. van: Viruszuivering en wat zij ons leert omtrent den aard van het virus. Tijdschr. o. Plz. 46, 97–126, 1940.

8. Markham, R. and K. M. Smith: A new crystalline plant virus. Nature 157, 300, 1946.
9. Pfankuch, E. und G. A. Kausche: Über Darstellung, Eigenschaften und quantitative Bestimmung von Tabakmosaik-Virus] und Kartoffel-X-virus und ihre physikochemische Differenzierung. Biochem. Zeitschr. 299, 334–345, 1938.
10. Price, W. C.: Crystallization of Southern bean mosaic virus. Science 101, 515–517, 1945.
11. Quanjer, H. M.: Bijdrage tot de kennis van de in Nederland voorkomende ziekten van tabak en van de tabaksteelt op kleigrond. Tijdschrift o. Plz. 49, 37–51, 1943.
12. Stanley, W. M.: Isolation of a crystalline protein possessing the properties of tobacco-mosaic virus. Science 81, 644–645, 1935.

WISSELBOUW VAN AARDAPPELRASSEN ALS BESTRIJDINGSMIDDEL TEGEN SCHURFT [1])

With a summary: Rotation of potato varieties as a control of scab.

DOOR

H. L. G. de Bruyn

Lab. v. Mycologie en Aardappelonderzoek, Wageningen

Het is gebleken, dat er verschillende rassen van Actinomyces bestaan, die schurft op aardappelen veroorzaken (1, 5, 7 en 8). Deze rassen verwekken op hetzelfde aardappelras verschillende typen van schurft, terwijl tevens vastgesteld werd, dat de aardappelrassen verschillend vatbaar zijn voor bepaalde Actinomyces-rassen. [2])

Gezien dit feit werd in 1939 (De Bruyn, 1) de vraag gesteld of wisselbouw van aardappelrassen van invloed zou zijn op het optreden van schurft bij langdurige aardappelverbouw op hetzelfde land. Op Bintje komt een oppervlakkig type schurft voor, veroorzaakt door een ander ras dan dat, welke de diepe schurft verwekt. Voor dit laatste is Eigenheimer zeer vatbaar. Bij langdurige verbouw van Bintje zal het ras van de oppervlakkige schurft in stand blijven en zich tevens sterk vermeerderen. Wordt verbouw van Bintje afgewisseld door die van Eigenheimer, dan gaat de ontwikkeling van dit ras achteruit.

Er werd vastgesteld, dat een passage door aardappel de virulentie van de schurftorganismen versterkt. Deze factor brengt bij voortdurende verbouw van hetzelfde aardappelras de ziekteverwekkers eveneens in het voordeel. Bij teelt van aardappelrassen, die voor vele schurfttypen resistent zijn, wordt de verzwakking van een groot aantal schurftrassen waarschijnlijk, zowel wat betreft de virulentie als wat betreft hun aantal. Dit zou de schurftaantasting van daarna geteelde vatbare aardappelrassen doen verminderen.

Om bovengenoemde theorie aan de praktijk te toetsen werd in 1939 met een proef begonnen. In een bak werd sterk met schurft besmet zand gebracht, af-

[1]) Ontvangen voor publicatie Juli 1947.

[2]) In verband met de nog weinig uitgewerkte systematiek van de Actinomyceten is geen verschil tussen rassen en soorten van Actinomyces gemaakt en wordt in dit artikel alleen van rassen gesproken.

komstig van vroegere proeven. Deze grond werd zeer nauwkeurig gemengd om een zo gelijkmatig mogelijke samenstelling te verkrijgen en daarna door glasplaten in 4 gedeelten gescheiden. In elk vak werd nu 6 jaar achtereen hetzelfde aardappelras geteeld. Om inbrenging van nieuwe schurftorganismen met de te poten knollen te voorkomen, werden alleen spruiten geplant, gegroeid aan met sublimaat ontsmette knollen. In ieder gedeelte werden steeds 12 spruiten gepoot. Daar de gebruikte zandgrond zeer arm was, is geregeld met A.S.F.-korrels gemest. De planten ontwikkelden zich dan ook zeer goed, terwijl het optreden van aardappelziekte door bespuiting met Bordeauxse pap werd verhinderd. De uitkomsten van het eerste jaar gaven een beeld van de sterkte van de aanwezige schurftorganismen in de besmette grond en van de voorkomende typen.

Het resultaat van het eerste jaar was als volgt:

Bintje: Zeer sterk oppervlakkige schurft. Zeer veel knollen waren voor meer dan de helft van het oppervlak aangetast. Diepe plekken kwamen ook voor, doch hun aantal was gering.

Eigenheimer: Vrij sterke, diepe schurft, geen ander type was aanwezig.

Alpha: Aantasting zwak, zieke plekken iets ingezonken.

Jubel: Aantasting zwak, deze lijkt veel op oppervlakkige schurft, enkele plekken waren iets ingezonken.

Gedurende 5 jaar was het type van aantasting van ieder aardappelras vrij constant, de graad van aantasting varieerde enigszins, vermoedelijk in verband met de weersomstandigheden.

Tengevolge van de oorlog werden de knollen van het zesde jaar in 1944 niet geoogst en bleven in de grond. In 1945 bleef alles braak liggen, er kwam iets opslag voor. In 1946 werd nu in ieder van de vier vakken 6 spruiten Bintje en 6 spruiten Eigenheimer geplant. Deze twee rassen werden gekozen om het verschil tussen het oppervlakkige en het diepe type schurft duidelijk uit te laten komen.

De resultaten waren:

Bintje na 6 jaar *Bintje*. Fig. 1.

Van 44 knollen slechts 1 gezond. Het oppervlakkige type schurft overheerst. Van enkele knollen is een zeer groot gedeelte van het oppervlak ziek. Daarnaast komen ook diepe schurftplekken voor. Het algemene ziektebeeld komt in sterkte vrijwel overeen met het oorspronkelijke in 1939.

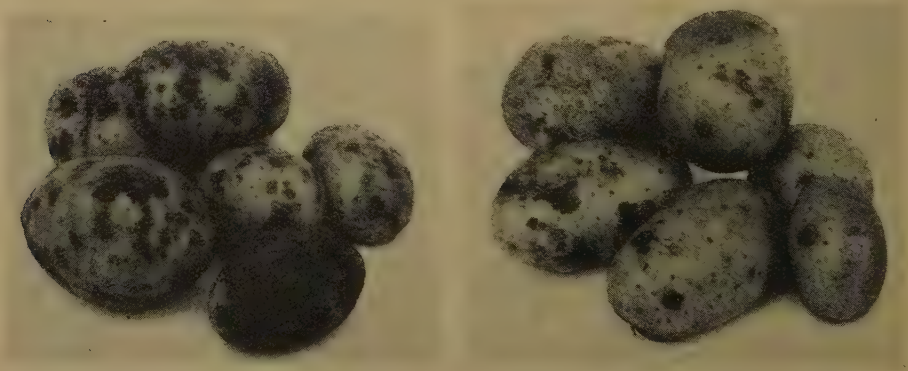


Foto J. Boekhorst

Fig. 1. Bintje links na 6 jaar Bintje, rechts na 6 jaar Eigenheimer

Bintje na 6 jaar *Eigenheimer*. Fig. 1.

Van 50 knollen ongeveer 20 gezond. Aantasting hoofdzakelijk oppervlakkig, doch veel minder dan die van het vorige vak. Slechts kleine plekken van het gehele oppervlak zijn ziek. Aantal diepe aantastingen gelijk aan die van na 6 jaar Bintje.

Bintje na 6 jaar *Alpha*.

Van 47 knollen 5 geheel gezond. Aantasting hoofdzakelijk van het oppervlakkige type, doch er komen ook diepe plekken voor. Ziekte minder dan bij vak 1 en 2.

Bintje na 6 jaar *Jubel*. Fig. 2.

Van 34 knollen 8 gezond. Hoofdzakelijk zeer kleine, diepe schurftplekjes. Bij oppervlakkige aantasting dikwijls stervormige tekening. Minder ziek dan de 3 vorige vakken.

Eigenheimer na 6 jaar *Bintje*. Fig. 3.

Van 49 knollen 4 gezond. Een groot aantal in het algemeen kleine, diepe plekken, vele nog in het beginstadium.

Foto J. Boekhorst

Fig. 2. Bintje na 6 jaar Jubel

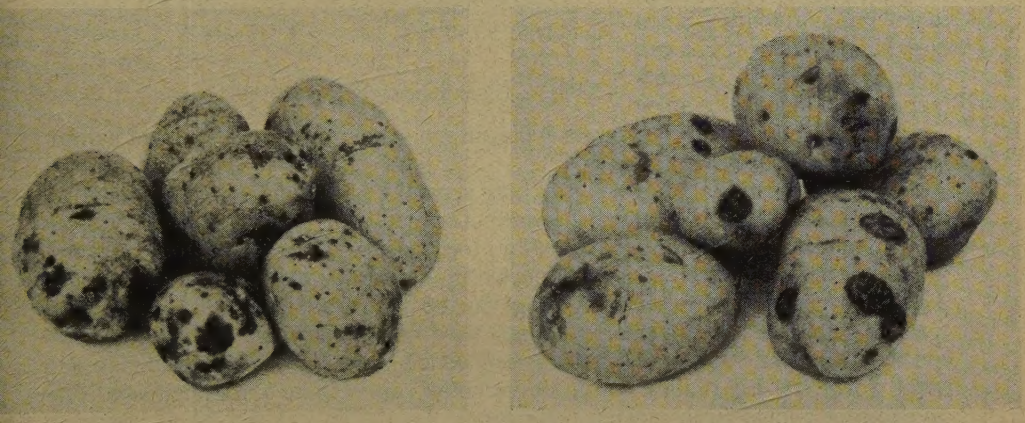


Foto J. Boekhorst

Fig. 3. Eigenheimer links na 6 jaar Bintje, rechts na 6 jaar Eigenheimer

Eigenheimer na 6 jaar *Eigenheimer*. Fig. 3.

Van 56 knollen 25 gezond, de overige met een groot aantal zeer diepe plekken, dikwijls samengesteld uit meerdere aantastingspunten. Een weinig oppervlakkige schurft komt ook voor.

Eigenheimer na 6 jaar *Alpha*.

Van 54 knollen 6 gezond. Enkele zeer grote diepe plekken, de meeste echter klein en diep. Aantasting minder dan na 6 jaar Eigenheimer.

Eigenheimer na 6 jaar *Jubel*. Fig. 4.
Van 41 knollen 11 gezond. Slechts een gering aantal kleine, diepe plekjes.

Het resultaat blijkt in overeenstemming te zijn met de geuite theorie. Zowel Bintje als Eigenheimer zijn het beste nadat 6 jaar Jubel verbouwd is, een ras, dat zelf weinig vatbaar is (Fig. 2 en 4). De aantasting van Eigenheimer na Eigenheimer is minder dan de oorspronkelijke in 1939, er komen in dit vak een groot aantal geheel gezonde knollen voor, zowel bij de Bintjes als bij de Eigenheimers. Wanneer de knollen ziek zijn is het diepe type echter sterk en in hevige vorm vertegenwoordigd. Na 6 jaar Bintje heeft het oppervlakkige type stand gehouden, de aantasting is gelijk gebleven en is gedurende de 6 jaar niet in kracht verminderd.

Alles wijst er op, dat de Actinomyceten, die het oppervlakkige type schurft verwekken, door voortdurende teelt van de vatbare Bintje hun virulentie in hoge mate behouden hebben en dat ook hun aantal niet is verminderd. Die van het diepe type zijn vermoedelijk in aantal achteruitgegaan, gezien het grote aantal gezonde knollen van het Eigenheimerperceel, doch hun virulentie is nog zeer sterk. De oorzaak van deze achteruitgang is onbekend. Na 6 jaar teelt van de resistente Alpha en Jubel is zoowel achteruitgang van virulentie als van het aantal organismen op te merken.

Foto J. Boekhorst

Fig. 4. Eigenheimer na 6 jaar Jubel

Voor de praktijk kan de gevolgtrekking gemaakt worden, dat — om schurft te doen verminderen (2) — behalve wisselbouw met andere gewassen, ook wisselbouw met resistente aardappelrassen kan toegepast worden, indien door omstandigheden herhaalde teelt van aardappelen op hetzelfde veld noodzakelijk is. Dit kan eveneens leiden tot vermindering van de schurftaantasting bij de daarna geteelde vatbare aardappelrassen. Waar voor wisselbouw met andere gewassen door verschillende auteurs (3, 4 en 6) een periode van 4–7 jaar noodzakelijk geacht wordt, zal het tijdvak tussen de verbouw van vatbare aardappelrassen een even groot aantal jaren moeten bedragen.

SUMMARY

Four potato varieties were grown in a frame filled with soil, heavily infected with scab. For six successive years each variety was grown on the same plot. After these six years two potato varieties, Bintje and Eigenheimer, were cultivated on all plots. The attack and type of scab varied according to the susceptibility of the potatoes grown during the preceding period. Where Jubel was cultivated for six years the attack was least, where Bintje had been grown successively much superficial scab occurred, in the Eigenheimer-plot many deep scab

lesions were found. Rotation with potato varieties resistant to scab may have good results if the disease occurs on later grown susceptible potato varieties. These results agree with the facts found by different authors (1, 5, 7, 8) viz. that different types of scab on the same potato are due to special races of Actinomyces, that the susceptibility of the different potato varieties to these Actinomyces-races is not the same and that the virulence of the scab organisms is increased through development on the living growing potato.

LITERATUUR

1. Bruyn, H. L. G. de, Onderzoekingen over enkele Actinomyceten, welke aardappelschurft verwekken. T. o. Plantenziekten 45: 133–156, 1939.
2. Bruyn, H. L. G. de, Aardappelschurft en vruchtopvolging. T. o. Plantenziekten 49: 100–108, 1943.
3. Cairns, H., T. N. Greeves and A. E. Muskett, The Control of Common Scab (Actinomyces scabies (Thaxt.) Güss.) of the Potato by Tuber Disinfection. Ann. Appl. Biol. 23: 718–742, 1936.
4. Goss, R. W., A survey of potato scab and Fusarium wilt in Western Nebraska. Phytopathology 24: 517–527, 1934.
5. Leach, J. G., P. Decker and H. Becker, Pathogenic races of Actinomyces scabies in relation to scab resistance. Phytopathology 29: 204–209, 1939.
6. Rode, A., Zur Frage des Kartoffelschorfes. Dtsch. Landw. Pr. 63: 4, 1936.
7. Schaal, L. A., Variation and physiologic specialization in the common scab fungus (Actinomyces scabies). J. Agr. Res. 69: 169–186, 1944.
8. Thomas, W. D., Growth and variation of six physiologic races of Actinomyces scabies on different culture media. Phytopathology 37: 319–331, 1947.

BOEKBESPREKING

Suppression of weeds by fertilizers and chemicals, geschreven door H. C. Long, I.S.O., B. Sc. (Agric) en W. E. Brenchley, D. Sc. Uitgave Crosby Lockwood & Son Ltd., London, 87 p., 16 platen en 14 tekstfig. Prijs 6 sh.

Bij het verschijnen van de tweede druk in 1946 blijkt van welk een inzicht de woorden getuigen, waarmede Sir D. Hall in 1934 de eerste druk inleidde. Zijn voorwoord besluit met de waarschuwing, dat het gebruik van chemische onkruidbestrijdingsmiddelen nimmer een verwaarlozen van de noodzakelijke grondbewerking ten gevolge mag hebben.

Nu, ten gevolge van het gebrek aan arbeidskrachten en hoge lonen, de onkruidbestrijding met chemische middelen in het middelpunt van de belangstelling staat, is men maar al te gaarne geneigd die maatregelen achterwege te laten, zonder welke een chemische onkruidbestrijding vergeleken kan worden met een asperientje, dat wel de pijn, maar niet de kwaal wegneemt.

In een boekje, voor de praktijk en voorlichting bestemd, had aan het eerste hoofdstuk — Losses due to weed infestation — meer aandacht besteed mogen worden. Wij missen hier een systematisch overzicht van de betekenis, die de onkruiden in de verschillende culturen hebben.

De Hoofdstukken 3 en 4: Effects of fertilizers in reducing weeds, en: The use of lime, hadden, hoewel zij krachtens de titel wel in het werkje thuishoren, niet

opgenomen mogen worden na hoofdstuk 2: Principles of Chemical weed control. Het geven van een noodzakelijke bemesting mag immers het bestrijden van de onkruiden niet ten doel hebben, maar slechts een nuttige bijkomstigheid zijn.

Hoofdstuk 5: Sulphate of ammonia and nitrate of soda, bespreekt de mogelijkheden om met een oplossing van deze zouten onkruiden in granen en grassen dood te spuiten. Deze wijze van onkruidbestrijding wordt in ons land niet toegepast, zodat wij onze ervaringen niet kunnen toetsen aan hetgeen hier vermeld wordt.

Hoofdstuk 6 daarentegen — Calcium cyanamide — geeft een goed overzicht van het gebruik van kalkstikstof. Gezien de betekenis, die in ons land kalkstikstof nog steeds heeft, zouden wij gaarne gezien hebben, dat dit hoofdstuk uitvoeriger behandeld was. Bovendien ontbreekt een duidelijke uiteenzetting over de betekenis van kalkstikstof bij de bestrijding van slofhak en windhalm in granen.

Hoofdstuk 7: Sulphuric acid, is voor ons van minder belang omdat ook deze werkwijze in ons land geen toepassing heeft gevonden. De mogelijkheid om met behulp van zwavelzuur onkruiden in uien te doden, dient ook spoedig in ons land onderzocht te worden omdat het er naar uitziet, dat de uiencultuur staat of valt met de mogelijkheden van een goede onkruidbestrijding.

De inhoud van de hoofdstukken 8 en 9: Sulphates of copper and iron, en: Finely powdered Kainit, heeft veel van zijn betekenis verloren omdat met de nieuwe middelen betere resultaten bereikt kunnen worden.

De alles dodende onkruidbestrijdingsmiddelen, die aangewend worden op plaatsen waar alle vegetatie gedood moet worden, zijn in de hoofdstukken 10 en 11 op duidelijke wijze behandeld.

In een boek, dat in 1946 geschreven is, had men mogen verwachten, dat aan de d.n.c.-bevattende middelen meer dan 3 bladzijden besteed zouden worden. Deze middelen vinden meer en meer ingang en, in ons land althans, heeft van de andere middelen alleen kalkstikstof zich naast d.n.c. kunnen handhaven.

De beknoptheid van hoofdstuk 13: Methoxone, het groeistofbevattend onkruidbestrijdingsmiddel, kan geweten worden aan het feit, dat tijdens het schrijven van dit hoofdstuk vele van de tegenwoordige bijzonderheden nog niet bekend waren.

Het laatste Hoofdstuk 14: Miscellaneous, maakt het boekje volledig door enkele woorden te wijden aan verschillende, minder bekende onkruidbestrijdingsmiddelen.

De schrijvers hebben de onvolledigheid van de Hoofdstukken 12 en 13 waarschijnlijk goed willen maken door in de Appendix een uiteenzetting op te nemen van de hand van Prof. G. E. Blackman, waarin deze de d.n.c.- en groeistofbevattende middelen behandelt. Zonder afbreuk te doen aan hetgeen Blackman schrijft, menen wij toch, dat het boek een meer afgerond geheel gevormd zou hebben, indien de appendix verwerkt was in de hoofdstukken 12 en 13.

Het grote risico, dat verbonden is aan het uitgeven van een boek over onkruidbestrijding, is gelegen in het feit, dat, vooral in de laatste jaren, een boek reeds spoedig na het verschijnen niet actueel meer is. Het voorziet dan ook nog niet in de leemte, die in de literatuur ontstaan is door de vele mogelijkheden, die de d.n.c.-middelen bieden en de perspectieven, die de groeistoffen in de toekomst zullen openen. Maar het geeft een duidelijk overzicht van de wegen, die men bewandelen kan om onkruiden te bestrijden. En het is keurig uitgevoerd en van talrijke duidelijke afbeeldingen voorzien.

A. P. Kole